

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

**Vergleichende Untersuchungen
über die Nucleotidverteilungsmuster
menschlichen Myometriums in
verschiedenen funktionellen Zuständen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Georg Henning Heiland
aus Hamburg

Marburg 1968

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Vergleichende Untersuchungen über die Nucleotidverteilungsmuster menschlichen Myometriums in verschiedenen funktionellen Zuständen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Georg Henning Heiland
aus Hamburg

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 22.2.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. P. Karlson

Correferent: Prof. Dr. R. Buchholz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
2. Experimenteller Teil	Seite 5
3. Ergebnisse	Seite 12
4. Besprechung der Ergebnisse	Seite 16
5. Zusammenfassung	Seite 20
6. Ergebnisse in Chromatogrammen und Tabellen	Seite 21
7. Literaturverzeichnis	Seite 30
8. Verzeichnis d. akadem. Lehrer	Seite 32
9. Lebenslauf	Seite 33

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen
verwendet:

AMP	: Adenosin-5'-monophosphat
ADP	: Adenosin-5'-diphosphat
ATP	: Adenosin-5'-triphosphat
CMP	: Cytidin-5'-monophosphat
CDP	: Cytidin-5'-diphosphat
CTP	: Cytidin-5'-triphosphat
DPN	: Diphosphopyridinnucleotid
GMP	: Guanosin-5'-monophosphat
GDP	: Guanosin-5'-diphosphat
GTP	: Guanosin-5'-triphosphat
G-1-P	: Glucose-1-phosphat
HMP	: Hexosemonophosphat
HS	: Harnsäure
IMP	: Inosin-5'-monophosphat
KP	: Kreatinphosphat
P _o	: anorganisches Phosphat
TrMP	: Triosemonophosphat
UMP	: Uridin-5'-monophosphat
UDP	: Uridin-5'-diphosphat
UTP	: Uridin-5'-triphosphat
UDP-G	: Uridin-5'-diphosphat-glucose
UDP-Ga	: Uridin-5'-diphosphat-galactose

Einleitung

Als erster Vertreter der Gruppe von Substanzen, die wir Nucleotide nennen, wurde 1847 von Justus von Liebig aus Fleischextrakten die Inosinsäure isoliert (15). Seither ist es gelungen, eine große Anzahl von Verbindungen dieser Gruppe zu entdecken, zu identifizieren und auch zu einem großen Teil ihre Bedeutung für den intermediären Stoffwechsel zu erkennen (4,5,6,16,31,34,35). Dies wurde dadurch ermöglicht, daß im Laufe der Zeit - besonders während der letzten 20 Jahre - die Methoden zur Trennung und Isolierung von Nucleotiden aus Substanzgemischen, z.B. säurelöslichen Gewebeextrakten, immer mehr verfeinert werden konnten.

Das große Interesse, das man den Nucleotiden entgegenbringt, erklärt sich wohl aus der Tatsache, daß sie an vielen wichtigen Stellen im Intermediärstoffwechsel zu finden sind. So gibt es viele Reaktionen, deren Ablauf

von der Anwesenheit eines bestimmten Nucleotids abhängig ist, sei es, daß dieses als Energiedonator - in Form eines der energiereichen Triphosphate - oder als Gruppenüberträger - sog. "beladene Transportmetabolite" - für die Reaktion notwendig ist.

Wichtige Funktionen erfüllen die Nucleotide unter anderem als präformierte Bausteine der Nucleinsäuren (Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure) und bei der Eiweißsynthese.

Nach der Art der Reaktionen, an denen sie beteiligt sind, und nach ihrer Funktion in diesen Reaktionen, kann man die Nucleotide in zwei Gruppen zusammenfassen. Nach dieser Einteilung fungieren sie

1. als pool von Bausteinen in den Systemen des Auf-, Um- und Abbaues,
2. als Gruppenüberträger.

Nach ihrer Löslichkeit in verdünnter Säure (z.B. 6 %iger Perchlorsäure) kann man die Nucleotide in säurelösliche und säureunlösliche einteilen. Die säurelöslichen werden auch als "freie Nucleotide" bezeichnet. Die säureunlöslichen sind Nucleinsäuren oder Bruchstücke von diesen.

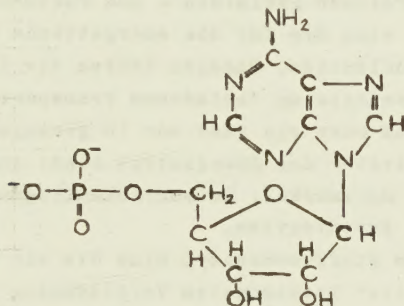
Der Bauplan der bei diesen Untersuchungen vorkommenden Nucleotide ist folgender:

Eine Base ist über eine N - Glycosidbindung mit einer Pentose verknüpft, die wiederum mit einem oder mehreren Phosphorsäureresten verestert ist. Bei den Basen handelt es sich um Purin- und Pyrimidinabkömmlinge, bei den Pentosen um Ribose und Desoxyribose. Ist die Pentose nicht mit einem Phosphorsäurerest verestert, wird die Verbindung als Nucleosid bezeichnet.

Die hier vorkommenden Nucleotide werden nach der Art der Base in Purin- und Pyrimidinnucleotide und nach der Anzahl der Phosphorsäurereste in Nucleosid - mono, di- und triphosphate eingeteilt. Zu den Purinabkömmligen zäh-

len AMP, ADP, ATP, ITP sowie GMP, GDP und GTP. Die hier hauptsächlich vorkommenden Vertreter der Pyrimidinabkömmlinge sind UMP, UDP und UTP⁺.

Als Beispiel für den strukturellen Aufbau sei hier die Formel von AMP angeführt:



Zur Auftrennung von Nucleotidgemischen und der Identifizierung der Bestandteile kann man sich verschiedener Methoden bedienen. Cretius arbeitete bei seinen Versuchen, in denen er ATP, ADP und AMP aus menschlicher Corpus - Uteri - Muskulatur trennte mit der papierchromatographischen Methode (3). Turba und Enenkel trennten die Adenosinphosphate mit Hilfe der Nieder - und Hochspannungselektrophorese (32,33).

Besondere Bedeutung hat die von W.E. Cohn in die Biochemie eingeführte Ionenaustauschchromatographie erlangt (1,2). Mit Hilfe dieser, im Laufe der Zeit modifizierten Methode kann man säurelösliche Extrakte auf ihren Gehalt an Nucleotiden untersuchen.

Entsprechend den verschiedenen Funktionen unterschiedlicher Gewebe, findet man bei ihnen quantitativ und qualitativ unterschiedliche Zusammensetzungen ihres Nucleotidgehaltes. Nach ihrem sog. Nucleotidverteilungsmuster

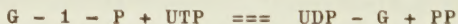
⁺Ein Verzeichnis der Abkürzungen findet sich vor der Einleitung.

kann man die Gewebe in zwei Hauptgruppen einteilen. Bei dieser Einteilung unterscheidet man den "Energietyp" und den "Stoffwechseltyp" (20,27).

Bei Geweben, die zum Energietyp gerechnet werden, wird das Bild des Chromatogrammes fast vollständig von den energiereichen Pyrimidin - und Purinnucleotiden geprägt. Dies sind die für die energetische Transformation wichtigen Nucleotide. Dagegen fehlen die für die Synthesevorgänge wesentlichen "beladenen Transportmetabolite" entweder ganz oder sie sind nur in geringen Mengen zu finden. Vertreter des Energietyps sind: quergestreifte Muskulatur, Herzmuskel, Heuschreckenflugmuskulatur, Thrombozyten und Erythrozyten.

Beim Stoffwechseltyp sind die als "beladene Transportmetabolite" bezeichneten Verbindungen dagegen vermehrt. Es sind dies unter anderem die Nucleosid - diphosphatderivate von Guanosin, Cytidin und Uridin, die mit verschiedenen Bausteinen beladen sind.

Bei der UDP - Glucose z.B. ist die Glucose der Baustein, der durch die Bindung an UDP auf ein höheres Energieniveau gebracht und dadurch reaktionsfähig gemacht wird. UDP - G findet sich vermehrt in der laktierenden Mamma, wie Smith und Mills nachweisen konnten (28). Die Glucose stammt hierbei aus dem Glycogen. Die Aktivierung geschieht auf folgende Weise - in Anwesenheit einer von Kalckar entdeckten spezifischen Pyrophosphorylase (11)-:



Durch Epimerisierung am 4. C - Atom entsteht aus der Glucose Galactose.

Als Vertreter des Stoffwechseltyps sind zu nennen: Leber, wachsende Hefe und Tumoren (10,14,27).

Nicht alle Gewebe lassen sich zwanglos einer der beiden genannten Gruppen zuordnen. So sind z.B. Milz, Gehirn und Linse sowie einige Tumorformen Gewebe, deren Chromatogramme zwischen Energietyp und Stoffwechseltyp einzureihen sind (13,17,27).

Experimenteller Teil

Das Material für die vorliegenden Versuche wurde bei Operationen in der Marburger Universitäts - Frauenklinik gewonnen⁺. Die nach Gefäßabbindung entnommenen Gewebestücke wurden sofort in flüssiger Luft eingefroren. Dadurch sollte die Inaktivierung der Enzyme im sog. "Frier-stop" erreicht werden, da besonders die Nucleosidtriphosphate und KP bei Wärme schnell umgesetzt werden. Auf diese Weise sollte der Stand der hier interessierenden Metabolitspiegel möglichst lebensgetreu für die Versuche fixiert werden. Wollenberger und Mitarbeiter (36) und

⁺Herrn Professor Huber, Direktor der Frauenklinik der Universität Marburg (jetzt Kiel), sind wir zu großem Dank für sein großzügiges Entgegenkommen bei der Überlassung des Materials verpflichtet.

Hohorst (8) weisen dararauf hin, daß beim Einfrieren von Gewebestücken in flüssiger Luft die Temperaturerniedrigung im Innern des Gewebes so langsam vor sich geht, daß schon ein großer Teil des KP abgebaut ist, bevor das Gewebe ganz durchgefroren ist. Bei ihren Tierversuchen kühlten sie das zu entnehmende Gewebe in situ vor der Excision zwischen zwei in flüssiger Luft abgekühlten Metallplatten. Durch diese Art der Gewebeentnahme erhielten sie besonders für KP höhere Werte. Diese Methode war bei den an Patienten durchgeführten Operationen nicht anwendbar, sodaß das excidierte Gewebe erst nach 2 bis 5 Sekunden in flüssige Luft eingelegt werden konnte, ohne vorgekühlt worden zu sein.

Die Versuchsanordnung der Ionenaustauschchromatographie geht auf W.E. Cohn zurück (1,2). Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde mit einer Modifikation der Methode gearbeitet, wie sie von Hurlbert und Mitarbeitern angegeben wurde (9).

Als Austauscherharz wurde Dowex 2-X₁₀ (200-400 mesh) in der Formiatform benutzt. Dowex ist der Handelsname für ein hochpolymeres Kunstharz, das sich wegen seiner großen Anzahl dissoziabler Gruppen gut als Austauscherharz eignet.

Im Handel befindet sich Dowex 2 in der Chloridform, aus der es für die Versuche durch Behandlung mit gesättigtem Natriumformiat und daran anschliessend mit konzentrierter Ameisensäure in die Formiatform übergeführt wurde.

Vorbereitung der Säule

Die Länge der benutzten Glassäulen schwankte zwischen 25 und 38 cm, ihre lichte Weite zwischen 0,5 und 1 cm (Angaben finden sich in den Legenden zu den einzelnen Versuchen).

Das Dowex 2-X₁₀ (200 - 400 mesh) in der Formiatform wurde in kleinen Portionen von ca. 1 - 2 ml in die

Glassäule gefüllt, nachdem die Ausflussöffnung der Säule mit Quarzwolle verschlossen worden war, die zwar die Elutionsflüssigkeit mit den in ihr gelösten Substanzen, nicht aber die Körner des Austauscherharzes durchließ. Die einzelnen Portionen Dowex wurden mit Pressluft aufeinander geschichtet, wobei darauf geachtet werden musste, daß die Harzsäule immer unter dem Aqua - bidest - Spiegel blieb, damit Unregelmässigkeiten in der Schichtung des Harzes vermieden wurden.

Herstellung des säurelöslichen Gewebeextraktes

Das eingefrorene Gewebestück wurde im Stahlmörser*, der flüssige Luft enthielt, grob zerkleinert. Die so gewonnenen Gewebebrocken wurden mit der 6 - 7 - fachen Menge eiskalter $0,6n\ HClO_4$ eine bis ein und eine halbe Minute im Homogenisator Ultra - Turrax (s. Anm. 1) homogenisiert. Im Kaltraum wurden die Gewebereste, die sich nicht gelöst hatten abzentrifugiert (20 min., 20 000 x g bei $\pm 0 - + 2^{\circ}\ C$). Zum Zentrifugieren wurde die Runne - Zentrifuge (s. Anm. 2) benutzt. Die nach dem Zentrifugieren überstehende Flüssigkeit wurde in einem in Eiswasser stehenden Messzylinder gesammelt. Das Sediment wurde nochmals mit dem 2 - 3 - fachen Volumen eiskalter $0,2n\ HClO_4$ homogenisiert und wie vorher zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereint und das Volumen bestimmt.

Der säureunlösliche Rückstand wurde auf der Analysenwaage gewogen und alle späteren Berechnungen auf 1 g dieses Feuchtgewichtsrückstandes bezogen.

Ungefähr 10% des Volumens wurden vom gelösten Extrakt abgezweigt und in der Tiefkühltruhe aufgehoben. An

Anm. 1: Hersteller: Firma Janke undKunkel KG, Stauffen
i. Br.

Anm. 2: Hersteller: Firma Runne Heidelberg

diesen Proben wurden später die Analysen auf anorganisches Phosphat und Gesamtphosphat durchgeführt und die Extinktionswerte bei 260 m μ und 275 m μ gemessen.

Die übrigen 90% des säurelöslichen Gewebeextraktes wurden im Eisbad mit KOH auf ca. pH 7 eingestellt. Als innerer Indikator wurde Phenolrot benutzt. Um die Bildung des KClO₄ - Niederschlages zu beschleunigen, wurde das Gefäß mit der neutralisierten Lösung ca. 1/2 Stunde lang im Kühlraum in ein Acetoneisbad gestellt und dann das Salz abzentrifugiert (10 min., 20 000 x g bei $\pm 0 - + 2^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde an der wie oben angegeben vorbereiteten Austauschersäule adsorbiert. Der dabei entstehende Durchlauf wurde auf anorganisches Phosphat und Gesamtphosphat untersucht und die Extinktionswerte bei 260 m μ und 275 m μ bestimmt. Die Säule wurde mit Aqua - bidest nachgespült, wobei die Menge an Aqua - bidest etwas größer gewählt wurde als das Volumen des säurelöslichen Extraktes war. Der dabei entstehende Durchlauf wurde wiederum aufgefangen und ebenfalls auf seinen Gehalt an anorganischem Phosphat und Gesamtphosphat untersucht. Gleichfalls wurden die Extinktionen bei 260 m μ und 275 m μ gemessen.

Elution

Die Säule mit dem adsorbierten säurelöslichen Extrakt wurde während des Versuches mit Ameisensäure und ameisen-saurem Ammoniumpuffer in langsam ansteigender Konzentration bei gleichbleibender Geschwindigkeit durchströmt. Durch das langsame Ansteigen der Konzentration der Elutionsflüssigkeit wurde erreicht, daß die verschiedenen adsorbierten Substanzen entsprechend ihren Selektivitätskoeffizienten eluiert wurden. Bedingungen für diese selektive Elution sind: langsam ansteigender pH - Wert und ein großes Überangebot an Ionen, da es sich bei der Elution um eine Verdrängungsreaktion handelt, für die das

Massenwirkungsgesetz gilt.

Die gleichmässige langsame Erhöhung der Konzentration der Elutionslösung wurde durch folgende, von Hurlbert und Mitarbeitern (9) angegebene Versuchsanordnung erreicht:

In einer Reservoirflasche befand sich Ameisensäure bzw. Ammonformiatlösung einer bestimmten Konzentration. Aus ihr wurde gleichmässig der Inhalt in eine Mischflasche gepumpt, die zu Anfang des Versuches 500 ml Aqua - dest enthielt. Ein Magnetrührer sorgte für die gute Durchmischung der Flüssigkeiten. Das entstehende Gemisch, dessen pH sich asymptotisch demjenigen in der Vorratsflasche annäherte, wurde in gleichem Maße, wie Flüssigkeit aus der Vorratsflasche nachlief, über ein Schlauchsystem auf die Austauschersäule geleitet.

Das aus der Säule ablaufende Eluat wurde in einem automatisch abfüllendem Fraktionssammler (s. Anm.) in Portionen von jeweils 4 ml gesammelt. Das Abfüllvolumen des Fraktionssammlers konnte variiert werden, wurde aber bei allen Versuchen bei 4 ml belassen. Auch die Durchströmungsgeschwindigkeit wurde bei allen Versuchen konstant gelassen. Sie betrug 8 - 10 min. für die Einzelportion von 4 ml.

Angaben über die Konzentration in der Vorratsflasche und den Wechsel der Vorratsflasche sind in den Legenden zu den einzelnen Chromatogrammen zu finden.

Phosphatbestimmung

a) anorganisches Phosphat

Der säurelösliche Extrakt, der Durchlauf des säurelöslichen Extraktes und der Aqua - bidest - Durchlauf wurden mit der von Rockstein und Herron angegebenen Methode auf anorganisches Phosphat untersucht (19).

Anm.: Hersteller: Firma Gilson, Madison (Wisconsin)

b) Gesamtphosphat

Von den ersten 120 gesammelten Fraktionen wurde je eine Probe entnommen, die auf ihren Gehalt an Gesamtphosphat untersucht wurde. Von Fraktion 121 an wurde nur jeder zweiten Fraktion eine Probe zur Gesamtphosphatbestimmung entnommen. Die Untersuchung auf Gesamtphosphat wurde auch am säurelöslichen Extrakt, dessen Durchlauf und am Aqua - bidest - Durchlauf durchgeführt, Die hier zur Gesamtphosphatbestimmung angewandte Methode war die von Hurlbert und Mitarbeitern angegebene (9).

Die bei den Phosphatbestimmungen nötigen Extinktionsmessungen wurden am Photometer Eppendorf bei einer Schichtdicke von 20 mm und der Wellenlänge 578 m μ vorgenommen.

Extinktionsbestimmungen

Die Extinktionen aller gesammelten 4 - ml - Fraktionen, sowie des säurelöslichen Extraktes, dessen Durchlaufes und des Aqua - bidest - Durchlaufes wurden am Zeiss-Photometer PQM in einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 260 m μ und 275 m μ durchgeführt, da die Absorptionsmaxima der Nucleotide in diesem Wellenbereich liegen. Der Quotient $E_{275} : E_{260}$ ist für die Basen der einzelnen Nucleotide charakteristisch. Zusammen mit der Lage der "peaks" im Chromatogramm diente er zur Identifizierung der einzelnen Nucleotide. Die Quotienten für die hier hauptsächlich vorkommenden Nucleotide sind folgende:

für Adenosin - Nucleotide: 0.4

für Guanosin - Nucleotide: 0.75

für Uridin - Nucleotide: 0.6

für Cytidin - Nucleotide: über 1.

Die einzelnen Extinktionsgipfel wurden anhand des Quotienten und durch Vergleich mit anderen in diesem Ar-

beitskreises durchgeführten Arbeiten identifiziert.

Für die zeichnerische Darstellung wurden die Phosphat - und Extinktionswerte auf die Feuchtgewicht-rückstandmenge von 1 g umgerechnet. Dadurch werden die Unterschiede augenscheinlicher, als dies bei den tatsächlichen, unterschiedlichen Rückstandsmengen der Fall gewesen wäre.

Ergebnisse

Die Untersuchungen, deren Ergebnisse hier wiedergegeben werden sollen, wurden an operativ gewonnenen Gewebestücken menschlicher Uteri durchgeführt. Dabei wurden Myometriumstücke von Uteri in verschiedenen funktionellen Zuständen untersucht. Es war dies:

- a) Myometrium aus geschlechtsreifen Uteri
("normales" Myometrium)
- b) Myometrium von Frauen in der Menopause
("seniles" Myometrium)
- c) Myomknoten oder Stücke davon
- d) bei sectio caesarea gewonnenes Gewebe aus
graviden Uteri.

Die Chromatogramme wurden so gezeichnet, daß auf der Abszisse die Zahl der Einzelfraktionen in der Reihenfolge, in der sie vom Fraktionssammler abgefüllt wurden, eingetragen wurden. Auf der Ordinate wurden die

Werte für Phosphat ($\mu\text{M}/\text{ml}$) und die Extinktionswerte (E_{260}/ml) eingetragen.

Beim Vergleich der Chromatogramme fällt auf, daß bei den verschiedenen Gruppen sowohl die Anzahl der peaks, als auch ihre Größe verschieden sind. Beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen sieht man, daß die $\sum E_{260} \text{ AMP} + \text{ADP} + \text{ATP} / \text{g RF}$, angegeben in Prozenten der adsorbierten Gesamtextinktion bei den Gruppen: normales Myometrium, seniles Myometrium und gravidum Myometrium nicht sehr verschieden ist, sondern jeweils um 40% beträgt. Bei den Myomen liegt dieser Wert höher (bei ca. 52%).

Die aufgetragene Extinktion pro Gramm Rückstand feucht war aber doch ziemlich verschieden. Der niedrigste Wert bei $E_{260} \text{ mp}$ wurde beim senilen Myometrium gefunden. Dieser Wert war bei den Myomen ungefähr $2 \frac{1}{2}$ mal so groß. Die anderen beiden Gruppen liegen zwischen diesen Werten. Die höhere Extinktion pro Gramm RF war bedingt durch das vermehrte Auftreten von Guanosin- und Cytidin-Nucleotiden und den erhöhten Anteil von AMP + ADP + ATP.

Bei dem Chromatogramm 1 handelt es sich um die Aufzeichnung eines Versuches, der mit normalem Myometrium durchgeführt wurde. Die Adenin-Nucleotide stehen mengenmäßig im Vordergrund, während die beladenen Transportmetabolite wie UDP-G und UDP-Ga nur in ganz geringer Menge vorhanden sind. Dieser Befund ähnelt den an quergestreifter Rattenmuskulatur erhobenen Befunden (7,27).

Chromatogramm 2 ist die Wiedergabe der Ergebnisse eines Versuches, bei dem seniles Myometrium untersucht wurde. Das Gewebe stammte von einer 57-jährigen Patientin, die sich seit knapp 7 Jahren in der Menopause befand. Bei der Patientin wurde eine supravaginale Uterusamputation unter Mitnahme beider Adnexe durchgeführt, da ein doppelt-faustgroßes Ovarialcystom mit adenocarcinomatöser Entartung bestand.

Die Gesamttextinktion pro g RF ist hier bedeutend niedriger als bei dem Chromatogramm 1. Sie beträgt im Mittelwert bei der Gruppe seniles Myometrium weniger als die Hälfte des bei der Gruppe "normales" Myometrium gefundenen Wertes. Auch hier erscheinen die Adenin - Nucleotide dominierend und die beladenen Transportmetabolite treten kaum in Erscheinung. Auch KP sowie HMP und TrMP konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Chromatogramm 3 gibt das Nucleotidverteilungsmuster wieder, wie es bei einem Myom gefunden wurde. Die Patientin, von der das Gewebe stammt, war zum Zeitpunkt der Operation 47 Jahre alt. Seit einem Jahr war ein Myom bekannt, das sich in der Beobachtungszeit vergrößert hatte. Es wurde eine abdominale totale Uterusexstirpation unter Mitnahme beider Adnexe vorgenommen. Der histologische Befund für das Operationsmaterial lautete: Uterus myomatosus mit subserösen Fundusmyomen⁺.

Die Anzahl der peaks ist im Vergleich zu den anderen Chromatogrammen vermehrt und der Flächeninhalt der bei den anderen Chromatogrammen auch vorhandenen peaks vergrößert. Die beladenen Transportmetabolite treten im Vergleich zu den vorherigen Gruppen bei diesem Versuch vermehrt auf.

An Gewebe aus dem Fundus eines graviden Uterus wurde der Versuch durchgeführt, dessen Ergebnisse hier als Chromatogramm 4 wiedergegeben sind. Auffallend ist der relativ große peak, der die Menge der UDP - Derivate wiedergibt. Die $\sum E_{260}$ AMP + ADP + ATP beträgt in dieser Gruppe knapp 39%.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabellen wiedergegeben (s.S. 28 u. 29). Die zugrunde liegenden Werte wurden alle auf das vergleichbare Rückstand - feucht - Ge-

⁺Herrn Dr. Overbeck, früher an der Universitäts - Frauenklinik Marburg, danken wir für die freundliche Überlassung der histologischen Befunde.

wicht von 1 g berechnet.

Die Anzahl der Versuche pro Gruppe betrug:
bei normalem Myometrium 6, bei senilem Myometrium 4,
bei den Myomen 8 und bei Myometrium aus gravidem
Uteri 3.

Besprechung der Ergebnisse

Gretius (3) untersuchte Muskulatur aus dem Corpus menschlicher Uteri von Frauen im geschlechtsreifen Alter und von Graviden zur Zeit des Geburtstermines. Mit Hilfe der papierchromatographischen Untersuchungsmethode fand er folgende Werte:

a) beim geschlechtsreifen Uterus:

ATP 0.61 μ Mol / g Feuchtmuskel

ADP 0.85 μ Mol / g Feuchtmuskel

AMP 0.90 μ Mol / g Feuchtmuskel

b) zur Zeit des Geburtstermines:

ATP 1.25 μ Mol / g Feuchtmuskel

ADP 1.64 μ Mol / g Feuchtmuskel

AMP 1.41 μ Mol / g Feuchtmuskel

Kaminski (12) untersuchte Myometrium aus geschlechtsreifen Uteri, Myometrium aus graviden Uteri und Myome. Die Untersuchungsmethode, mit der er bei sei-

nen Versuchen arbeitete, war die des enzymatisch - optischen Testes. Als Bezugsgröße nahm er bei seinen Berechnungen 1 g Frischgewebe. Er kam bei seinen Untersuchungen zu folgenden Werten:

a) bei Myometrium aus geschlechtsreifen Uteri:

ATP 0.919 μMol / g Frischgewebe

ADP 0.396 μMol / g Frischgewebe

AMP 0.301 μMol / g Frischgewebe

b) Myometrium aus graviden Uteri:

ATP 0.813 μMol / g Frischgewebe

ADP 0.402 μMol / g Frischgewebe

AMP 0.252 μMol / g Frischgewebe

c) bei Myomgewebe:

ATP 0.785 μMol / g Frischgewebe

ADP 0.242 μMol / g Frischgewebe

AMP 0.160 μMol / g Frischgewebe

Die Schwierigkeit beim Vergleich der Arbeiten, die mit verschiedenen Untersuchungsmethoden durchgeführt wurden liegt in den unterschiedlichen Bezugsgrößen für die Berechnungen.

Die wiedergegebenen Chromatogramme weisen entsprechend den verschiedenen Geweben, die den Versuchen zugrunde lagen, einige Unterschiede auf.

Allgemein kann wohl gesagt werden, daß mit der sich ändernden Funktion eines Gewebes sich dessen Nucleotidverteilungsmuster ändert. So ändert sich auch das Bild des Chromatogrammes vom Myometrium in verschiedenen Lebensaltern und bei besonderen Beanspruchungen, wie in der Gravidität oder bei vermehrtem Wachstum, wie es bei Myomen auftritt.

Die Gesamttextinktion pro g RF ist am niedrigsten beim senilen Myometrium, dem keine besonderen Aufgaben mehr zufallen. Am höchsten ist sie bei den Myomen, bei denen auch die UDP - Derivate als Vertreter der belade-

nen Transportmetabolite vermehrt gefunden wurden. Letzteres dürfte in der vermehrten Syntheseleistung, wie sie beim Wachstum mit dem vermehrten Aufbau von Zwischenzellsubstanzen angetroffen wird, zurückzuführen sein. Auch bei Myometrium aus gravidem Uterus findet sich eine deutliche Vermehrung der UDP - Derivate. Strominger (29,30) und Knippers (13) weisen auf die Bedeutung der UDP - Derivate bei der Synthese der Zwischenzellsubstanzen hin.

Der prozentuale Anteil der Adenin - Nucleotide an der Gesamttextinktion pro g RF liegt bei normalem, senilem und gravidem Myometrium bei ca. 40%, bei den Myomen bei ca 52%.

Cretius (3) fand bei seinen Untersuchungen am Myometrium aus Uteri in der Menopause einen deutlichen Abfall von ADP und ATP gegenüber geschlechtsreifem Myometrium. Ausserdem fand er für ADP und ATP im Myometrium zur Zeit des Geburtstermines fast doppelt so hohe Werte wie bei Gewebe aus geschlechtsreifen Uteri. Letzterer Befund konnte von Kaminski (12) und auch in diesen Untersuchungen nicht wieder gefunden werden, wobei betont werden muß, daß die Anzahl der hier vorliegenden Versuche zur Gruppe des graviden Myometriums zu klein ist, um sichere Aussagen zuzulassen.

Als Faktoren, die die Ergebnisse beeinträchtigen, sind zu nennen:

- 1.) Die kleine Anzahl der Versuche innerhalb der einzelnen Gruppen,
- 2.) die Schwierigkeiten bei der Materialgewinnung (da bei den Operationen die Gefäße abgeklammt werden mussten, wurden die später zu untersuchenden Gewebestücke noch bevor sie eingefroren werden konnten von der O₂-Zufuhr abgeschnitten),
- 3.) die unterschiedliche Größe der einzelnen Pro-

ben und die daraus resultierenden unterschiedlichen Zeiten, die benötigt wurden, bis die Gewebestücke durchgefroren waren.

Zusammenfassung

Es wurden die säurelöslichen Gewebeextrakte aus normalem (= geschlechtsreifem), senilem und gravidem menschlichem Uterus sowie Myome hinsichtlich ihrer Gehalte an freien Nucleotiden untersucht.

Dabei zeigte sich, daß die Gesamttextinktion ($E_{260 \text{ m}\mu}$) pro g Rückstand - feucht in folgender Reihenfolge zunimmt: seniles, gravides, normales Myometrium und Myom.

Die Σ AMP + ADP + ATP liegt beim Myom bei ca. 52%, bei den anderen Gruppen bei ca. 40%.

Die Ergebnisse lassen darauf schliessen, daß die synthetisierenden Gewebe entsprechend früheren Untersuchungen (13,29,30) mehr UDP - Derivate enthalten.

Ergebnisse in Chromatogrammen und Tabellen

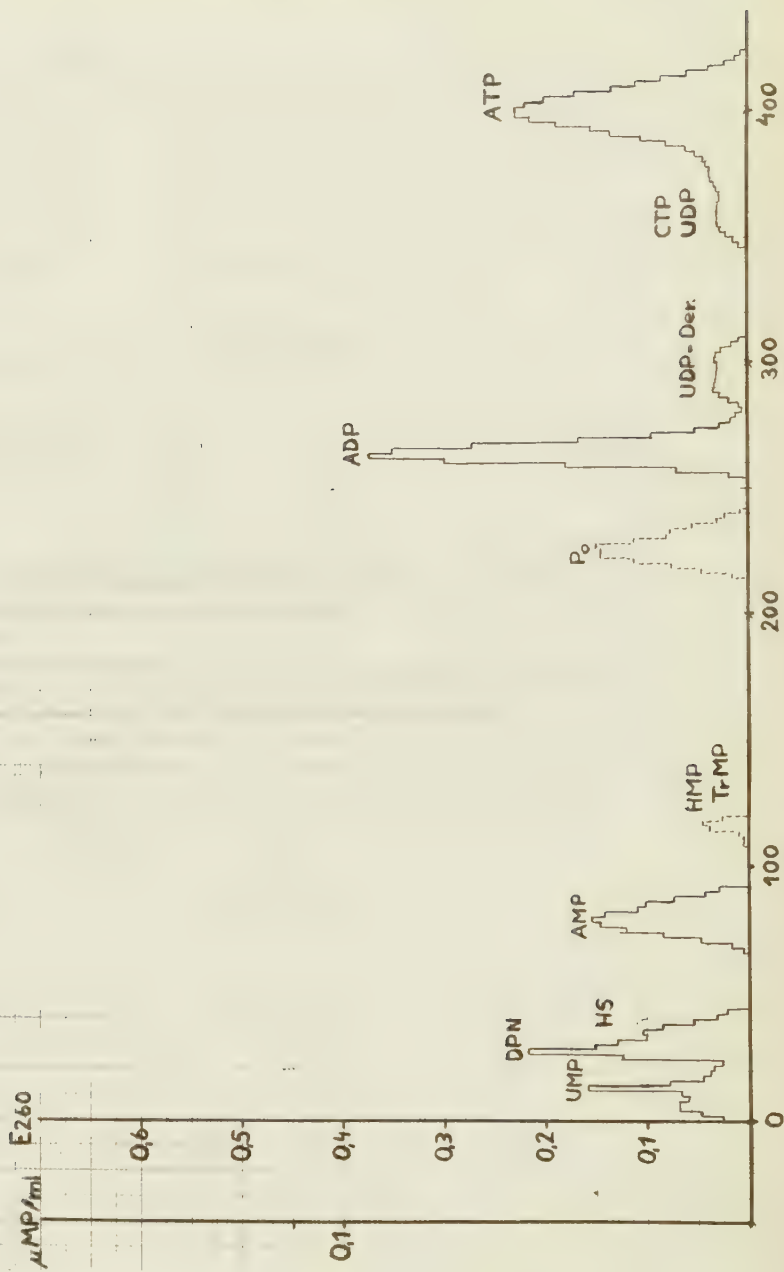


Abb.2: Chromatogramm1 (geschlechtsreifes Myometrium) Legende s.S. 2

$\mu\text{MMP/ml}$ E260

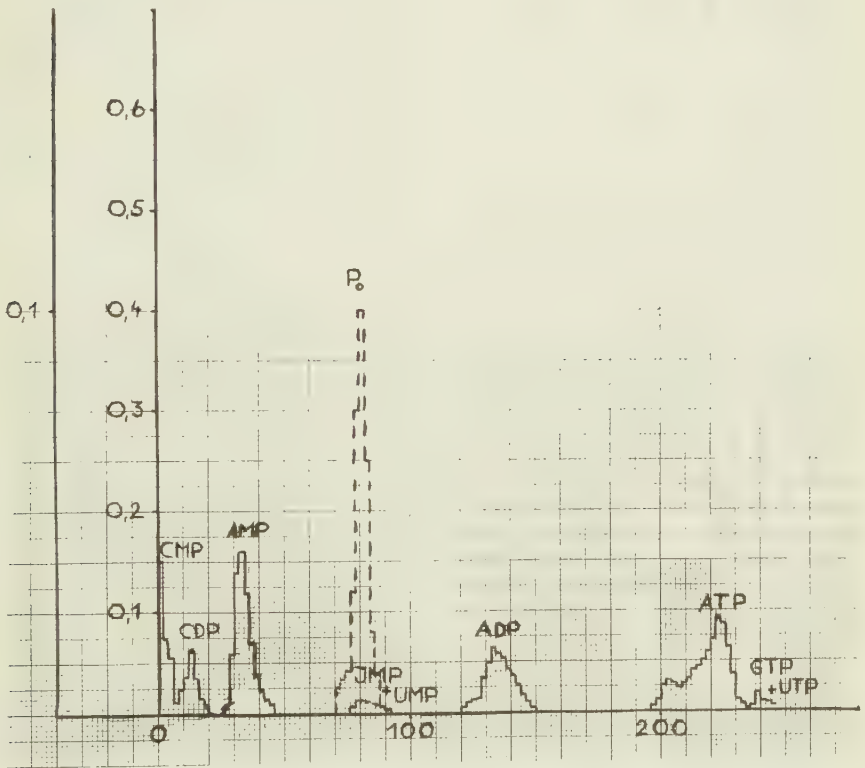


Abb.3: Chromatogramm 2 (seniles Myometrium) Legende s. S. 26

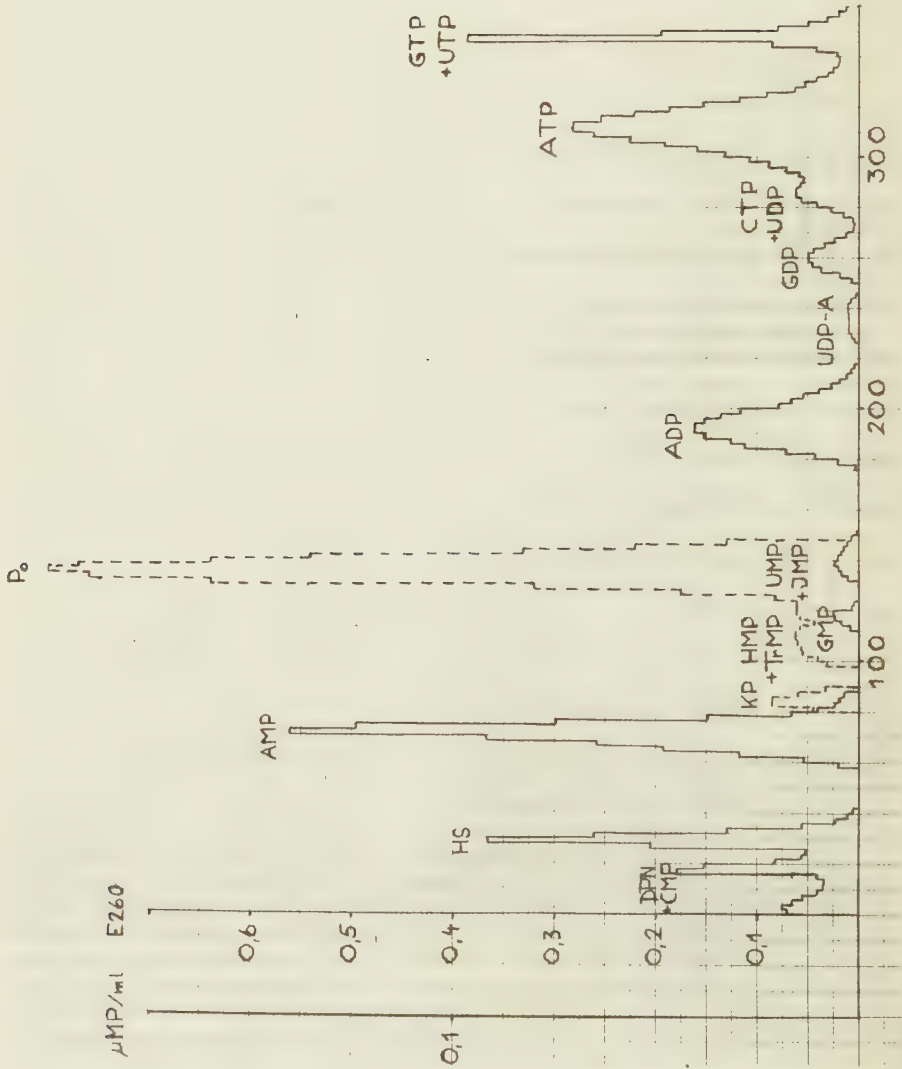


Abb. 4: Chromatogramm 3 (Myom) Legende s. S. 27

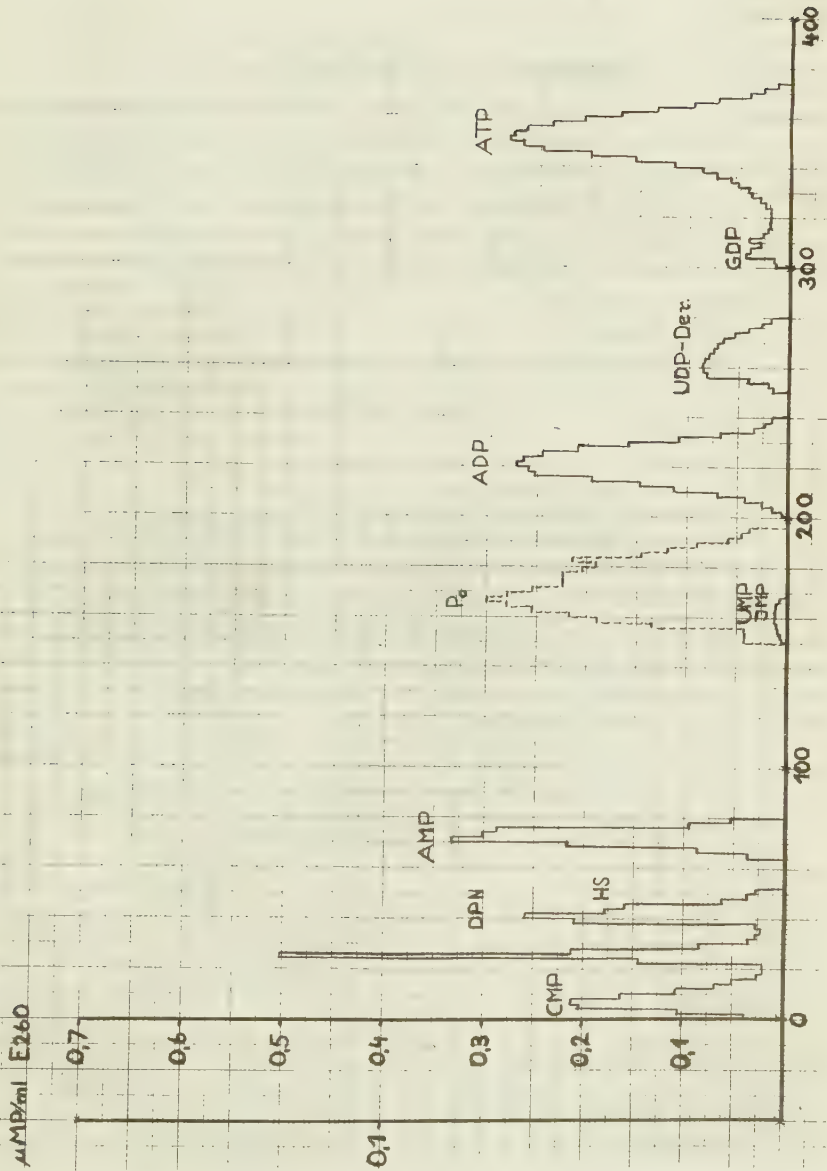


Abb. 5: Chromatogramm 4 (gravides Myometrium) Legende s. S.27

Legende zu Abb. 2 (S. 22):

Ionenaustauschchromatogramm von geschlechtsreife~~m~~ Myometrium (Gewebe aus dem Uterus einer 37-jährigen Patientin, bei der eine abdominale Totalexstirpation des Uterus unter Mitnahme der Adnexe wegen Bestehens eines ca. kindskopfgroßen Myoms durchgeführt wurde).

Austauscher: Dowex 2-X₁₀ in der Formiatform;

Säule: 0,8 x 35 cm;

Mischflasche: 500 ml H₂O;

Elution: 1-89 0,5n HCOOH; 90-215 3n HCOOH; 216-Ende
4n HCOOH + 0,4n HCOONH₄.

Legende zu Abb. 3 (S. 23):

Ionenaustauschchromatogramm von senilem Myometrium (Die Patientin befand sich seit 7 Jahren in der Menopause. Operation: supravaginale Uterusexstirpation unter Mitnahme der Adnexe wegen linksseitiger Ovarialcyste mit adenocarcinomatöser Entartung).

Austauscher: Dowex 2-X₁₀ in der Formiatform;

Säule: 0,5 x 35 cm;

Mischflasche: 500 ml H₂O;

Elution: 1-50 0,5n HCOOH; 51-180 3n HCOOH; 181-Ende
4,0 n HCOOH + 1,0 n HCOONH₄.

Legende zu Abb. 4 (S. 24):

Ionenaustauschchromatogramm von Myomgewebe
(Gewebe aus dem Uterus einer 47-jährigen Patientin,
die noch regelmäßig ihre Periodenblutungen hatte. Seit
ca. 2 Jahren verlängerte Blutungen wegen Uterus myoma-
tosus. Operation: abdominale Uterusexstirpation unter
Belassung der Adnexe).

Austauscher: Dowex 2-X₁₀ in der Formiatform;

Säule: 0,8 x 30 cm;

Mischflasche: 500 ml H₂O;

Elution: 1-60 0,5n HCOOH; 61-210 3n HCOOH; 211-Ende
4n HCOOH + 0,4n HCOONH₄.

Legende zu Abb. 5 (S. 25):

Ionenaustauschchromatogramm von gravidem Myo-
metrium (bei sectio caesarea gewonnen).

Austauscher: Dowex 2-X₁₀ in der Formiatform;

Säule: 0,8 x 30 cm;

Mischflasche: 500 ml H₂O;

Elution: 1-60 0,5n HCOOH; 61-198 3n HCOOH; 199-Ende
4n HCOOH + 0,4n HCOONH₄.

Tabelle I

Gruppe	1. $\sum E_{260}$ adsorbiert	2. $\sum E_{260}$ AMP in % von 1	3. $\sum E_{260}$ ADP in % von 1	4. $\sum E_{260}$ ATP in % von 1	5. $\sum E_{260}$ AMP+ADP +ATP in % von 1	6. Anzahl d. Versuche
Normales Myometrium	m=79,627 s=17,792	m=7,61 s=0,51	m=11,74 s= 1,27	m=20,35 s= 7,17	m=39,01 s= 6,24	6
Inaktives Myometrium	m=32,331 s=10,636	m=14,64 s= 5,48	m=10,46 s= 2,11	m=20,98 s= 7,62	m=44,24 s= 8,73	4
Myome	m=86,889 s=24,811	m=17,15 s= 4,15	m=16,27 s= 3,98	m=23,10 s=11,94	m=52,47 s=16,02	8
Gravides Myometrium	m=57,656 s= 2,974	m= 7,50 s= 3,43	m=14,70 s= 1,26	m=16,56 s= 3,23	m=38,76 s= 4,51	3

m=arithmetisches Mittel; s=mittlere Abweichung

Tabelle II
=====

Gruppe	$\mu\text{Mol AMP}$ pro g RF	$\mu\text{Mol ADP}$ pro g RF	$\mu\text{Mol ATP}$ pro g HF	$\mu\text{Mol GMP+UMP}$ pro g RF	$\mu\text{Mol TrMP +HMP}$ pro g RF	$\mu\text{Mol KP}$ pro g RF	Anzahl d. Versuche
Normales	m=0,3825	m=0,6441	m=1,1347				6
Myometrium	s=0,126	s=0,149	s=0,530				
Inaktives	m=0,2501	m=0,1785	m=0,2985				4
Myometrium	s=0,135	s=0,065	s=0,106				
Myome	m=0,9804	m=0,7368	m=0,8405	m=0,5789	m=0,6603	m=0,3030	8
	s=0,623	s=0,472	s=0,380	s=0,364	s=0,284	s=0,125	
Gravides	m=0,3165	m=0,5829	m=0,6679				3
Myometrium	s=0,103	s=0,082	s=0,165				

m=arithmetisches Mittel; s=mittlere Abweichung

Literaturverzeichnis

1. Cohn, W.E.: J. Am. Chem. Soc. 72, 1471 (1950)
2. Cohn, W.E.: J. Cell. Comp. Physiol. 38, Supplement I p. 21 (1951)
3. Cretius, K.: Z. Gebh. u. Gyn. 149, 131 (1958)
4. Emden, G. u. M. Zimmermann: Z. physiol. Chem. 167, 114 (1927)
5. Euler, H.v. u. E. Alder: Z. physiol. Chem. 238, 233 (1936)
6. Harden, A. and W. Young: J. Chem. Soc. 87, 189 (1905)
7. Heimsoth, V.H.: Dissertation med. Fak. Marburg 1960
8. Hohorst, H.J.: Habilitationsschrift Marburg 1963
9. Hurlbert, R.B., H. Schmitz, A.F. Brumm and V.R. Potter: J. Biol. Chem. 209, 23 (1954)
10. Jesse, G.: Dissertation med. Fak. Marburg 1962
11. Kalckar, H.M.: Nature 172, 1036 (1953)
12. Kaminski, K.: Dissertation med. Fak. Marburg 1966
13. Knippers, R.: Dissertation med. Fak. Marburg 1962
14. Lahrtz, H.: Dissertation med. Fak. Marburg 1963
15. Liebig, J.v.: Ann. 62, 1317 (1847)
16. Lohmann, K.: Biochem. Z. 202, 466 (1927)
17. Lohmann, K.: Biochem. Z. 282, 109 (1935)
18. Mandel, u. Klethi J.: Biochem. et Biophys. Acta 28, 199 (1958)
19. Rockstein, M. u. P.W. Herron: Analyt. Chem. 23, 1500 (1951)
20. Saukkonen, J.J.: Ann. Med. Exper. Fenniae 45, Supplement Nr. 3 (1956)
21. Schmitz, H., Hurlbert R.B., and V.R. Potter: J. Biol. Chem. 209, 41 (1954)
22. Schmitz, H., V.R. Potter, and D.M. White: Cancer Research 14, 66 (1954)

23. Schmitz, H.: *Naturwissenschaften* 41, 120 (1954)
24. Schmitz, H.: *Biochem. Z.* 325, 555 (1954)
25. Schmitz, H.: *Biochem. et Biophys. Acta* 14, 160 (1954)
26. Schmitz, H., V.R. Potter u. R.B. Hurlbert: *Z. f. Krebsf.* 60, 419 (1955)
27. Schmitz, H.: 11. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft f. physiol. Chem. p.1, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1960)
28. Smith, E.E.B., and G.T. Mills: *Biochem et Biophys. Acta* 13, 386 (1954)
29. Strominger, J.L.: *J. Biol. Chem.* 234, 1520 (1959)
30. Strominger, J.L.: *Biochem. et Biophys. Acta* 36, 83 (1959)
31. Theorell, H.: *Biochem. Z.* 278, 263 (1935)
32. Turba, F., und Enenkel H.J.: *Naturwiss.* 38, 189 (1951)
33. Turba, F., und Enenkel H.J.: *Naturwiss.* 38, 188 (1951)
34. Warburg, O., und W. Christian: *Naturwiss.* 26, 235 (1938)
35. Warburg, O.: *Wasserstoffübertragende Fermente*, Verlag Dr. Werner Saenger, Berlin (1948)
36. Wollenberger, A., O. Ristan u. A. Schoffa: *Pflügers Archiv* 270, 399 (1960)

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

an der Philipps-Universität Marburg:

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Förster, Gedigk, Groß, Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt, Hornung, Huber, Kessler, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Müller, Neubauer, Niessing, Nieth, Oksche, Petry, Schiff, Schmid, Schmitz, Schwaiger, Seidel, Siegert, Stein, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Waller, Wendt, Würterle,

an der Freien Universität Berlin:

Franke, Harndt, v. Herrath, Krauland, Loeschke, Maßhoff, Neubert, Schmidt, Schröder, Selbach, Siebert, Spier.

Lebenslauf

Am 8. August 1940 wurde ich in Hamburg geboren. Seit 1944 wohnten meine Eltern, Waldemar Heiland und seine Ehefrau Gertrud, geb. Renner, in Steinheim am Main, wo mein Vater ein zahntechnisches Labor betrieb. Dort besuchte ich auch die Grundschule.

Von 1950 bis 1959 war ich Schüler am Leibniz-Realgymnasium in Offenbach am Main, wo ich 1959 die Reifeprüfung bestand.

Vom Sommer-Semester 1959 an studierte ich an der Marburger Philipps-Universität Medizin. Das Physikum legte ich nach dem Sommer-Semester 1961 ab.

Die experimentellen Arbeiten für die eingereichte Dissertation wurden in der Zeit vom Winter-Semester 1961/62 bis zum Winter-Semester 1962/63 im Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg durchgeführt.

Im Sommer-Semester 1963 und im Winter-Semester 1963/64 studierte ich als Austauschstudent an der Freien Universität Berlin.

Zum Sommer-Semester 1964 kehrte ich nach Marburg zurück und bestand dort im Oktober 1965 das medizinische Staatsexamen.

Seit Dezember 1965 bin ich als Medizinal-Assistent am städtischen Krankenhaus in Frankfurt/Main-Höchst tätig.

